

和菓子の賞味期限予測のための耐熱性芽胞菌増殖予測モデルの開発 Development of Bacterial Spore Growth Predictive Model for Predictive at Best-Before Date of Japanese-Style Confection

岡久修己*
Naoki Okahisa

抄 録

市販の和菓子等から分離した耐熱性芽胞菌 42 株から、耐熱性や高浸透圧ストレスへの耐性が最も高い *B.subtilis* を「高浸透圧ストレス耐性株」として選抜した。選抜菌を用いて、スクロース、グルコース、フルクトースの各糖について、各種水分活性における菌の増殖挙動を調べた結果、スクロースと比較してグルコースやフルクトースは、より高い水分活性で *B.subtilis* の増殖を抑制することが確認できた。この内、スクロースで水分活性を調整した際に得られたデータについて解析を行い、水分活性から、菌の増殖時間を予測するモデルを構築した。

1 はじめに

近年、消費者の嗜好の変化、健康志向の高まりから、食品に対して低甘味化を求める傾向が強まっており、和菓子においても低糖度の製品開発が求められている。しかし、和菓子の製造における加熱条件では、*Bacillus*属等の耐熱性芽胞菌が最終製品に残存する場合があります。常温流通している製品が多いことから、低糖度化により耐熱性芽胞菌による変敗の危険性が高まっている。こうしたことから、従来品よりも低糖度の和菓子を開発するためには、水分活性と耐熱性芽胞菌の増殖性の関係を把握しておく必要がある。そこで本研究では、幅広い水分活性で増殖する「高浸透圧ストレス耐性芽胞菌」を用いて、液体培地中での各種水分活性における菌の増殖性を調べ、得られたデータを解析し、和菓子の賞味期限を予測する際の判断基準となる、耐熱性芽胞菌の増殖予測モデルの開発を行った。

2 実験方法

2・1 耐熱性芽胞菌の分離

市販和菓子等から標準寒天培地(日水製薬社)を用いた混釈平板培養法により菌を分離した。コロニーの色や形状をもとに、代表的なコロニーを標準寒天培地に移植し、純培養した菌について、定法どおりグラム染色および顕微鏡観察を行ない、コロニーや

細胞の形態、芽胞の有無等から耐熱性芽胞菌と推定される菌を分離した。

2・2 分離菌の同定

分離菌については、生化学的手法および16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析により同定を行った。生化学的手法は、アピ50CHB(bioMerieux社)を使用した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、菌体より抽出したDNAを鋳型としてPCRにより5'末端側約500 bpの領域を増幅し、サイクルシーケンス法で決定した。得られた配列についてBLASTを用いてDNA塩基配列データベース(GenBank/DDBJ/EMBL)に対して相同性検索を行った。

2・3 芽胞の調製

供試菌を Schaeffer's sporulation medium¹⁾に接種し、37°Cで 7 日間振盪培養後、顕微鏡により芽胞の形成を確認した。遠心分離(冷却下 7000rpm 15 分)により集菌し、上清を捨てペレットを滅菌水で 3 回洗浄した後、滅菌水で懸濁し芽胞懸濁液とした。

2・4 糖添加培地の調製

試験に使用した糖添加培地は、メイラード反応を避けるため、121°Cで 15 分間加熱した Nutrient Broth (Difco 社)(pH7.2)にあらかじめ調べておいた、培地の水分活性が所定の値となる量の糖を加え調製した。水分活性は、水分活性計(デカゴン社製、アクアラブ CX-2)により測定した。

2・5 高浸透圧ストレス耐性芽胞菌の選抜試験

供試菌の芽胞懸濁液を80℃で20分間加熱処理し、前述の方法でスクロースにより水分活性を0.94~0.91に調整した液体培地に4.0logCFU/ml前後となるように接種後、30℃で20日間振盪培養を行い増殖の有無を調べた。増殖の有無は、液体培地のOD₅₉₀を測定することによって判定した。予めOD₅₉₀測定と同時に混積平板培養法を行い生菌数を求め、検量線を作製し、OD₅₉₀を生菌数に換算することで、生菌数が6.0log CFU/mlを超える際のOD₅₉₀=0.02を増殖の有無を判断する基準とした。

2・6 高浸透圧ストレス耐性芽胞菌の耐熱性試験

供試菌の芽胞懸濁液を8.0logCFU/ml 前後となるように調製し、80℃および100℃で20分間加熱処理を行い、混積平板培養法によりそれぞれの生菌数を求めた。80℃20分加熱時の生菌数に対する100℃20分加熱時の生菌数の割合を芽胞生存率として求めた。

2・7 各種水分活性における耐熱性芽胞菌の挙動の把握

供試菌の芽胞懸濁液を100℃で20分間加熱処理し、糖無添加(水分活性1.00)および、スクロース、グルコース、フルクトースで水分活性を0.99~0.90に調整した液体培地に3.0~3.7logCFU/mlとなるように接種し、30℃および20℃で振盪培養を行った。接種直後から3時間毎にOD₅₉₀を測定し、生菌数が6.0logCFU/mlを超えるOD₅₉₀=0.02に達するまでの時間を調べた。

2・8 増殖予測モデルの構築

スクロースで水分活性を調整した液体培地中で、菌が増殖した(6.0logCFU/mlに達した)場合を1、増殖しなかった場合を0とし、従属変数とした。次に、水分活性と、増殖時間の対数値を独立変数とし、ロジスティック回帰分析を行い増殖予測モデルを構築した。解析にはR var.2.8.1²⁾を使用した。

3 結果および考察

3・1 高浸透圧ストレス耐性芽胞菌の選抜

選抜の対象とする菌は、市販の和菓子等から分離した耐熱性芽胞菌42株とした。分離菌の同定結果と、スクロースを用いた場合の高浸透圧ストレスに対する選抜試験の結果を表1に示した。菌種の内訳は、

42株中 *Bacillus* 属が40株、*Geobacillus* 属が2株であり、*Bacillus* 属の内、*B.subtilis* が18株、*B.cereus* が6株、*B.megaterium* が5株、*B.licheniformis* が2株、*B.firmus* が1株、種不明が8株であった。菌種により、高浸透圧ストレスへの耐性に大きな差がみられ、特に *B.subtilis* が、高浸透圧ストレスへの耐性が高い傾向がみられた。分離菌の中から、水分活性0.92以下で増殖可能な *B.subtilis* 9株(379, 513, 896, 1147, 1150, 1202, U-18, S-26, B-2)と、*B.megaterium* 1株(S-22)を選抜した。選抜した10株について、芽胞の耐熱性を調べた結果を表2に示した。耐熱性試験により、100℃20分間処理後の芽胞生存率が最も高い *B.subtilis* S-26株を以降の試験に用いる「高浸透圧ストレス耐性株」として選抜した。

表1 分離菌の菌種と各種水分活性(スクロースで調整)における増殖の有無

No.	菌種	水分活性			
		0.94	0.93	0.92	0.91
88	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
218	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	-	-
256	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
376	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
379	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-
384	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-
462	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	-	-
464	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
467	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
513	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+
540	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
568	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	-	-
665	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
731	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-
734	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
737	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
738	<i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-
740	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-
830	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
872	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	-	-
881	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-
896	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-
956	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
1147	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-
1150	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-
1202	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+
U-1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
U-4	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-
U-7	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
U-8	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
U-18	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+
S-3	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
S-6	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
S-8	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-
S-12	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	+	+	-	-
S-22	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	-
S-26	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+
S-39	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	-	-
S-50	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	+	+	-	-
S-52	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-
B-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	-	-
B-2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-

+: 増殖有 - : 増殖無

表2 100°C20分加熱における芽胞の生存率

No.	菌種	生存率*
379	<i>Bacillus subtilis</i>	<0.01%
513	<i>Bacillus subtilis</i>	<0.01%
896	<i>Bacillus subtilis</i>	<0.01%
1147	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1%
1150	<i>Bacillus subtilis</i>	<0.01%
1202	<i>Bacillus subtilis</i>	5%
U-18	<i>Bacillus subtilis</i>	50%
S-22	<i>Bacillus megaterium</i>	<0.01%
S-26	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
B-2	<i>Bacillus subtilis</i>	50%

* : 80°C20分加熱時の生菌数に対する100°C20分加熱時の生菌数の割合

3・2 各種水分活性における耐熱性芽胞菌の挙動の把握

各糖を液体培地(Nutrient Broth)に加えた際の水分活性と糖度(Brix)の関係を図1に示した。グルコース、フルクトースは、スクロースと比較して、より低濃度で液体培地の水分活性を低下させた。

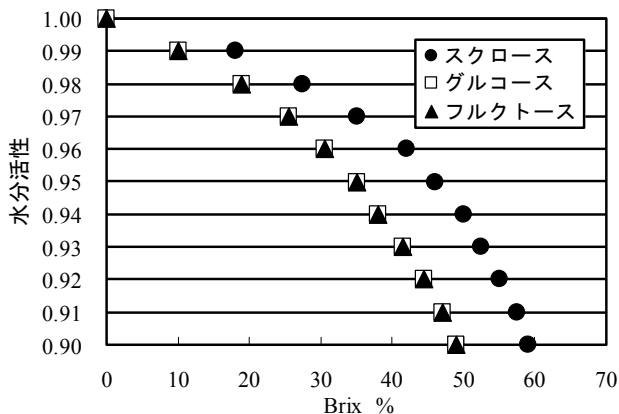


図1 各糖の水分活性とBrixの関係

各種水分活性における菌の増殖時間(菌数が6.0logCFU/mlに達するまでの培養時間)について、30°C培養時を表3に、20°C培養時を表4に示した。30°C培養時は、スクロースで水分活性を調整した場合、水分活性が低下するに従い増殖時間が長くなり、水分活性0.90では、培養720時間後でも菌数の増加が確認できず、増殖が停止した。一方、グルコースの場合は、0.92まではスクロースとよく似た挙動を示したが、0.91で増殖が停止し、フルクトースの場合は、0.93で増殖が停止した。20°C培養時には、30°C培養時と比較して、各糖共に、増殖時間が長くなり、スクロースは水分活性0.91、グルコース、

フルクトースは0.93で増殖が停止した。

以上より、スクロースと比較して、グルコースやフルクトースは、より高い水分活性で、つまりはより低濃度で、*B.subtilis*の増殖を抑制することが確認できた。本結果は、和菓子製造企業に限らず、様々な食品製造企業で、低糖度化商品の開発に有効利用可能である。

表3 30°C培養時における各糖による水分活性と増殖時間の関係

水分活性	6.0logCFU/mlに達するまでの培養時間(hour)		
	スクロース	グルコース	フルクトース
1.00*	12±0	12±0	12±0
0.99	12±0	15±0	12±0
0.98	15±0	18±0	12±0
0.97	18±0	20±1.5	18±0
0.96	27±2.1	24±0	24±2.4
0.95	39±2.7	32±1.5	55±8.8
0.94	65±4.5	54±7.5	85±22
0.93	92±13	94±24	>720
0.92	160±29	135±38	>720
0.91	249±29	>720	>720
0.90	>720	>720	>720

* : 糖無添加

表4 20°C培養時における各糖による水分活性と増殖時間の関係

水分活性	6.0logCFU/mlに達するまでの培養時間(hour)		
	スクロース	グルコース	フルクトース
1.00*	26±1.5	26±1.5	26±1.5
0.99	27±2.1	33±0	24±0
0.98	33±0	39±0	30±0
0.97	44±1.5	51±0	42±4.2
0.96	66±2.1	59±4.5	59±6.2
0.95	94±1.5	95±4.5	93±13
0.94	182±29	186±9.8	197±106
0.93	397±44	>720	>720
0.92	585±78	>720	>720
0.91	>720	>720	>720
0.90	>720	>720	>720

* : 糖無添加

3・3 増殖予測モデルの構築

スクロースで水分活性を調整した際に得られた、菌の増殖が確認された水分活性の範囲(30°C培養時は水分活性1.00~0.91, 20°C培養時は水分活性1.00~0.92)のデータについて、ロジスティック回帰分析を行い、水分活性(Aw)および増殖時間の対数値

($\ln(\text{time})$)から、菌が増殖する(生菌数が $6.0 \log \text{CFU/ml}$ に達する)確率(P)を予測するモデルが表5の計算式で定められた。また、表5の計算式から、 $P=0.5$ の際の A_w と $\ln(\text{time})$ の関係が表6の計算式で定められた。

表5 菌の増殖確率, 水分活性, 増殖時間の関係

30°C培養時	$\ln\{P/(1-P)\} = -467 + 451A_w + 10.3 \ln(\text{time})$
20°C培養時	$\ln\{P/(1-P)\} = -382 + 365A_w + 7.24 \ln(\text{time})$

表6 水分活性と菌の増殖時間の関係

30°C培養時	$A_w = -0.0228 \ln(\text{time}) + 1.035$
20°C培養時	$A_w = -0.0198 \ln(\text{time}) + 1.045$

図2, 3に30°Cおよび20°C培養時の水分活性と菌の増殖時間の実測値と、表6の計算式から求められた計算値を示した。両条件共に計算値は実測値とよく一致したので、表6で示された計算式はスクロースで水分活性を調整した際の耐熱性芽胞菌の増殖予測モデルとして、十分利用可能であると考えられた。

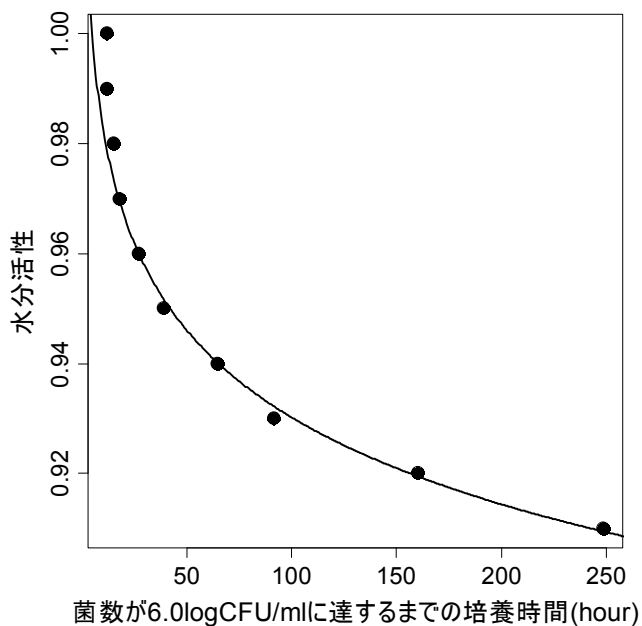


図2 30°C培養時の水分活性と増殖時間の実測値と計算値の適合

● : 実測値の平均 実線 : 計算値

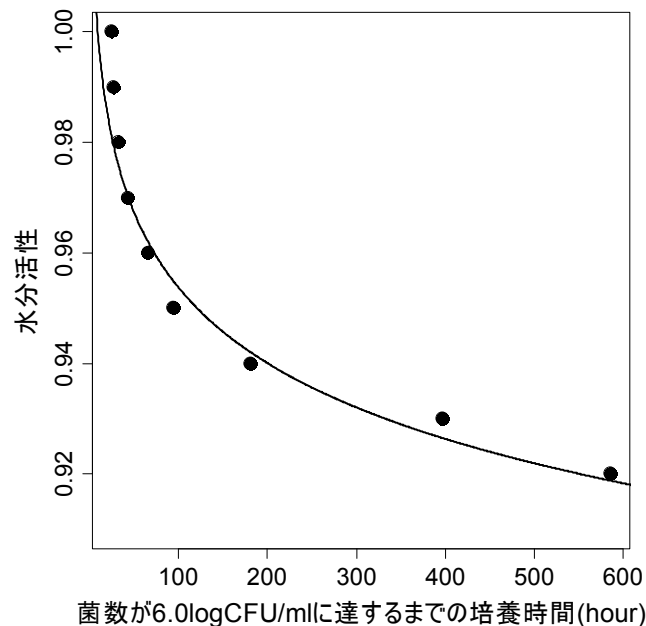


図3 20°C培養時の水分活性と増殖時間の実測値と計算値の適合

● : 実測値の平均 実線 : 計算値

このモデルを利用することで、水分活性から耐熱性芽胞菌が増殖するまでの時間を計算することができ、賞味期限の予測が可能となる。逆に、耐熱性芽胞菌の増殖時間から、必要な水分活性を求めることも可能である。こうしたことから、本モデルは、和菓子製造企業が、新商品の開発や、既存商品の賞味期限見直しを行う際に、有効利用できると考えられる。

なお、本報告では和菓子の賞味期限予測に活用する目的で、スクロースを用いた場合の水分活性と菌の増殖時間の関係性に着目したが、本試験で得られたデータからは、温度、水分活性、培養時間、糖の種類等の各種環境要因によって、菌の増殖確率がどのように変化するか等、他にも様々な情報を導き出すことが可能である。

4 まとめ

(1) 市販の和菓子等から分離した耐熱性芽胞菌42株から、耐熱性や高浸透圧ストレスへの耐性が最も高い *B.subtilis* を「高浸透圧ストレス耐性株」として選抜した。

(2) 選抜菌を用いて、スクロース、グルコース、フルクトースの各糖について、各種水分活性におけ

る菌の増殖挙動を調べた結果、スクロースと比較してグルコースやフルクトースは、より高い水分活性で *B.subtilis* の増殖を抑制することが確認できた。

(3) スクロースで水分活性を調整した際に得られたデータについて解析を行い、水分活性から、菌の増殖時間を予測するモデルを構築した。

謝辞

本研究は平成 21 年度 JST シーズ発掘試験「和菓子の賞味期限予測のための耐熱性芽胞菌増殖予測モデルの開発」の助成を受けて実施した。また、データ解析手法について貴重なご助言を頂いた、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の小関成樹博士に深謝する。

参考文献

- 1) Schaeffer, P., J. Millet, and J.-P. Aubert. “Catabolic repression of bacterial sporulation.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.54(3), pp.704-711(1965)
- 2) R. Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>